

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Radikal Bebas

##### 2.1.1 Definisi Radikal Bebas

Radikal bebas adalah senyawa yang bereaksi dengan komponen-komponen sel yang penting untuk mempertahankan kehidupan sel, baik komponen-komponen struktural (misalnya molekul-molekul penyusun membran) maupun komponen-komponen fungsional (misalnya enzim-enzim DNA). Kerusakan oksidatif ini dipengaruhi oleh banyak faktor seperti: komposisi substrat (misalnya komposisi asam lemak); konsentrasi oksigen, prooksidan yang dapat berupa *Reactive Oxygen Species (ROS)*; logam transisi, dan protein yang mengandung besi dan enzim (Purnomo, 2000 dan Sulistyowati, 2000).

Senyawa kimia ini sangat reaktif dan mengandung *Unpaired* elektron pada orbital luarnya sehingga sebagian besar radikal bebas ini bersifat tidak stabil. Radikal bebas dapat berfungsi sebagai pengoksidasi maupun pereduksi, sehingga radikal bebas dapat merusak komponen-komponen sel tubuh. Radikal bebas tersebut dapat mengoksidasi asam nukleat, protein, lemak, bahkan DNA sel dan menginisiasi timbulnya penyakit kanker (Leong, 2002).

Radikal bebas dibentuk oleh metabolisme *Xenobiotic* atau metabolisme sel aerob secara normal. *Reactive Oxygen Species (ROS)* adalah radikal bebas yang berperan penting pada beberapa proses fisiologis organ tubuh. Pembentukan ROS dapat menginduksi peroksidasi lipid yang bersifat sitotoksik akibat inisiasi suatu

reaksi rantai ke dalam membran, diikuti reaksi propagasi sehingga secara keseluruhan mengakibatkan kerusakan sel (Sikka, 2004).

### 2.1.2 Jenis Radikal Bebas

Ada dua bentuk umum dari radikal bebas yaitu ROS dan *Reactive Nitrogen Species* (RNS). Termasuk ROS di antaranya ion *Superoxide* ( $O_2^-$ ), *Hydrogen peroxide* ( $H_2O_2$ ), *Hydroxyl radical* ( $OH^\bullet$ ), dan *Peroxyl radical* ( $OOH^\bullet$ ). Sementara RNS sering dianggap sebagai subklas dari ROS, di antaranya *Nitric oxide* (NO), *Nitrous oxide* ( $N_2O$ ), *Peroxynitrite* ( $NO_3^-$ ), *Nitroxyl anion* (HNO) dan *Peroxynitrous Acid* ( $HNO_3^-$ ) (Marciniak *et al.*, 2009; Kothari *et al.*, 2010).

ROS (*Reactive Oxygen Species*) terdiri dari kelompok radikal bebas dan kelompok non radikal. Kelompok radikal bebas antara lain *Superoxide Anion* ( $O_2^-$ ), *Hydroxyl Radical* (OH) dan *Peroxyl Radicals* ( $RO_2^\bullet$ ), sedangkan yang termasuk kelompok non radikal misalnya *Hydrogen peroxide* ( $H_2O_2$ ) dan *Organic peroxides* (ROOH) (Halliwell dan Whiteman, 2004).

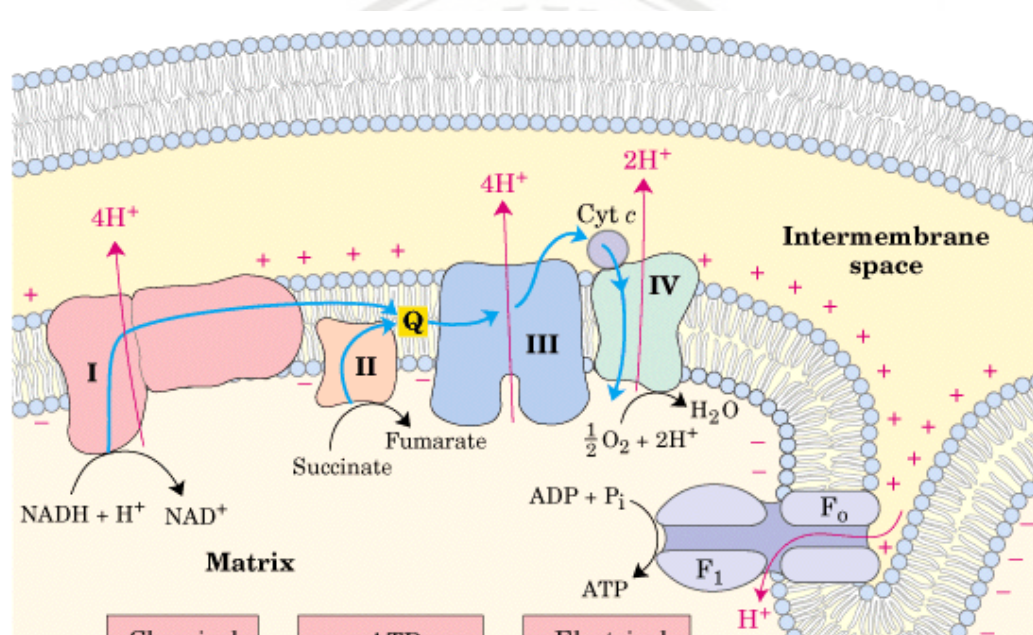
### 2.1.3 Pembentukan Radikal Bebas

Radikal bebas di produksi dalam sel yang secara umum melalui reaksi pemindahan elektron, menggunakan mediator enzimatik atau non enzimatik. Produksi radikal bebas dalam sel dapat terjadi secara rutin maupun sebagai reaksi terhadap rangsangan. Secara rutin adalah superoksida yang dihasilkan melalui aktivasi fagosit dan reaksi katalisa seperti *ribonukleotida reduktase*. Sedangkan reaksi melalui rangsangan disebabkan oleh karena kebocoran superoksida, hidrogen peroksida dan kelompok oksigen reaktif (ROS) lainnya pada saat bertemunya bakteri dengan fagosit teraktifasi (Droge, 2002).

*Reactive Oxygen Species* dapat terbentuk sebagai produk samping selama reaksi oksidasi fosforilasi dalam rantai transpor elektron pada mitokondria. Oksidasi fosforilasi bertujuan untuk membentuk energi dalam bentuk ATP. Pembentukan ATP tersebut membutuhkan  $O_2$ , tetapi tidak semua  $O_2$  berikatan dengan hidrogen untuk membentuk air, sekitar 4% s.d. 5% berubah menjadi radikal bebas (Ngurah, 2007; Figueiredo *et al.*, 2008; Marciniak *et al.*, 2009).

Proses reaksi oksidasi fosforilasi melibatkan sejumlah kompleks enzim, seperti yang terlihat pada gambar 2.5. Kompleks enzim I dikenal dengan *Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Dehydrogenase* (NADH) yang mentransfer elektron dari NADH dalam matriks mitokondria menuju *coenzim-Q* melalui *coenzim riboflavin* yaitu *Flavine Mononucleotide* (FMN). *Coenzim-Q* juga menerima elektron dari kompleks enzim II melewati *coenzim riboflavin* yakni *Reduced Flavine Adenine Dinucleotide* (FADH). Kompleks enzim II terdiri atas tiga jenis enzim, yang semuanya mengandung FAD sebagai gugus prostetikanya, yaitu; *succinate dehydrogenase* yang mentransfer elektron berasal dari siklus asam sitrat, *glycerol-3 phosphate dehydrogenase* mentransfer elektron yang berasal dari *glycerol phosphate shuttle*, dan *fatty acyl-CoA dehydrogenase* mentransfer elektron dari tahap pertama dalam  $\beta$ -oksidasi asam lemak. Dari koenzim Q elektron ditransfer menuju kompleks enzim III (*cytochrome c reductase*). Kompleks enzim III terdiri dari dua komponen protein yakni *cytochrome b* dan *c1*. Dari kompleks III elektron diteruskan menuju *cytochrome c* untuk selanjutnya menuju kompleks IV (*cytochrome oxidase*). Kompleks IV terdiri dari dua komponen protein yakni *cytochrome a* dan *a3*. Dari kompleks IV elektron direaksikan dengan  $O_2$  untuk membentuk air. Kompleks I, III, dan IV

memompa proton ke dalam ruang antar membran sehingga terjadi *gradient* muatan listrik antar membran. Adanya gradien ini memungkinkan proton mengalir kembali menuju matrik mitokondria melalui *ATP Synthase complex* (kompleks V) dan perubahan energi dari proses ini digunakan untuk membentuk ATP dari *Adenosine Diphosphate* (ADP). Dalam kompleks IV, elektron akan bereaksi dengan oksigen untuk membentuk air (Pelley, 2007). Skema rangkaian proses tersebut digambarkan dalam gambar 2.1.



(Botjje *et al.*, 2004)

Gambar 2.1  
Oksidasi Fosforilasi.  
Produksi ROS Terutama Terjadi pada Kompleks I dan III

Satu molekul oksigen direduksi menjadi dua molekul air. Reduksi tersebut dilakukan dengan mentransfer empat elektron. Tetapi transfer elektron tersebut berlangsung empat tahapan. Hal ini terjadi karena dua elektron yang tidak berpasangan pada molekul oksigen terletak pada orbit yang berbeda dan menunjukkan angka putaran quantum yang sama, padahal untuk membentuk ikatan kovalen, dua elektron harus terletak pada orbit yang sama dan



menunjukkan putaran yang berlawanan. Dengan demikian, maka oksigen hanya mampu menerima elektron tahap demi tahap dan hanya satu elektron tiap tahapnya. Pemindahan elektron yang tidak sempurna tersebut mengakibatkan terbentuknya ROS (Winarsi, 2007). Elektron pertama mereduksi oksigen untuk membentuk *Anion superoxide*, kemudian reduksi berikutnya membentuk *Hydrogen peroxide* dan *Hydroxyl radical*, elektron terakhir mereduksi *Hydroxyl radical* menjadi air ( $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$ ,  $O_2^{\bullet -} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$ ,  $H_2O_2 + e^- + H^+ \rightarrow OH^{\bullet} + H_2O$ ) (Marciniak *et al.*, 2009).

Di dalam sel sumber utama ROS adalah *Anion superoxide* dan hidrogen yang terbentuk sebagai produk samping metabolisme seluler seperti oksidasi fosforilasi dalam mitokondria (Waris dan Ahsan, 2006).

Konversi *Superoxide* menjadi hidrogen peroksida dilakukan oleh enzim SOD, sedangkan hidrogen peroksida menjadi air oleh enzim GPx atau *Catalase* (CAT). Jika hal ini tidak terjadi, hidrogen peroksida dapat mengalami reaksi *Fenton's* dengan kehadiran ion besi ( $Fe^{2+}$ ) untuk menghasilkan *Hydroxyl radical* yang lebih merusak (Figueiredo *et al.*, 2008).

Kompleks I dan III merupakan tempat utama produksi *Superoxide*. *Superoxide* yang terbentuk di dalam matrik dieliminasi dalam kompartemen tersebut oleh enzim MnSOD. Sementara itu, sebagian  $O_2^{\bullet -}$  yang diproduksi dalam ruang antar membran dibawa ke dalam sitoplasma melalui *Voltage Dependent Anion Channel* (VDAC), atau dapat juga dieliminasi oleh enzim CuZnSOD (Figueiredo *et al.*, 2008).

#### 2.1.4 ROS (*Reactive Oxygen Species*) sebagai Penyebab Kerusakan Sel

Kerusakan jaringan akibat ROS (*Reactive Oxygen Species*) dikenal dengan stress oksidatif, sedangkan faktor yang dapat melindungi jaringan terhadap ROS

(*Reactive Oxygen Species*) disebut antioksidan. Berbagai jaringan yang dapat mengalami kerusakan akibat ROS (*Reactive Oxygen Species*) diantaranya adalah *Deoxyribo Nucleid Acid* (DNA), lipid dan protein. Interaksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) dengan basa dari DNA dapat merubah struktur kimia DNA, apabila tidak direparasi akan mengalami mutasi yang dapat diturunkan, terutama bila terjadi pada DNA sel germinal baik di dalam ovarium maupun testis, sedangkan kerusakan DNA pada sel somatik dapat mengarah pada inisiasi keganasan (Bender, 2009).

Radikal bebas telah diyakini menimbulkan terjadinya peroksidasi lipid membran sel (Ngurah, 2007; Setiawan dan Suhartono, 2007; Golden dan Melov, 2001; Kothari *et al.*, 2010), kerusakan DNA dan apoptosis (Khotari *et al.*, 2010). Kerusakan oksidatif pada senyawa lipid terjadi ketika senyawa radikal bebas bereaksi dengan senyawa PUFA (*Poly Unsaturated Fatty Acids*). Peroksidasi lipid dapat dideteksi dari produk yang dihasilkannya di antaranya MDA (*Malondialdehyde*), lipid hidroperoksida, isoprostan (Marciniak *et al.*, 2009).

MDA (*Malondialdehyde*) merupakan senyawa dialdehida dengan rumus molekul  $C_3H_4O_2$ , yang dapat dihasilkan dari oksidasi asam lemak tidak jenuh oleh radikal bebas. Oleh karena itu, konsentrasi MDA yang tinggi menunjukkan adanya proses oksidasi dalam membran sel (Winarsi, 2007). Misalnya, pada olahraga dengan intensitas tinggi (80% s.d. 95% maksimum repetisi) terbentuk MDA yang lebih banyak dibandingkan dengan olahraga intensitas rendah (20% s.d. 35% maksimum repetisi) (Guzel *et al.*, 2007).

Peroksidasi lipid terjadi melalui beberapa tahapan reaksi yaitu inisiasi, propagasi dan terminasi :

$LH + \text{oksidan } L\bullet + \text{oksidan-H (inisiasi)}$

$L\bullet + O_2 \rightarrow LOO\bullet \text{ (propagasi)}$

$LOO\bullet + LH \rightarrow L\bullet + LOOH \text{ (propagasi)}$

$L\bullet + L\bullet \rightarrow \text{produk non radikal (terminasi)}$

$L\bullet + LOO\bullet \rightarrow \text{produk non radikal (terminasi)}$

Lipid (LH) penyusun membran sel biasanya berupa asam lemak tak jenuh ganda. Peroksidasi dimulai (inisiasi) dari abstraksi atom hidrogen pada gugus metilen oleh ROS membentuk radikal karbon ( $L\bullet$ ). Apabila radikal karbon bereaksi dengan oksigen maka akan terbentuk radikal peroksil ( $LOO\bullet$ ). Reaksi berikutnya adalah abstraksi atom hidrogen lipid lain oleh radikal peroksil membentuk lipid hidroperoksida yang bersifat sitotoksik ( $LOOH$ ), sehingga terjadi reaksi berantai. Reaksi akan berakhir (terminasi) jika radikal karbon yang terbentuk pada tahap inisiasi ataupun radikal lain yang terbentuk pada reaksi propagasi bereaksi dengan radikal lain menjadi produk non radikal (Setiawan dan Suhartono, 2007).

Oksidasi lipid merupakan hasil kerja radikal bebas yang diketahui paling awal dan paling mudah pengukurannya. Reaksi ini paling sering dilakukan untuk mempelajari stress oksidatif. Peroksidasi lipid merupakan inisiasi reaksi berantai oleh radikal hydrogen atau oksigen, yang menyebabkan teroksidasinya asam lemak tak jenuh ganda (PUFA). PUFA lebih rentan terhadap reaksi radikal bebas dibandingkan dengan asam lemak jenuh. Jembatan metilen yang dimiliki PUFA merupakan sasaran utama bagi radikal bebas yang akan membentuk radikal alkil, peroksil dan alkalosil (Winarsi, 2007).

### 2.1.5 Minyak Goreng *Deep Frying* sebagai Salah Satu Sumber Radikal Bebas

Proses menggoreng bahan pangan terdiri dari dua macam yaitu sistem gangsa (*pan frying*) dan menggoreng biasa (*deep frying*). Proses menggoreng sistem gangsa (*pan frying*) menggunakan suhu pemanasan yang lebih rendah dari suhu pemanasan pada sistem *deep frying*. Proses menggoreng dengan sistem gangsa ialah bahan pangan yang digoreng tidak sampai terendam dalam minyak (Ketaren, 2008). Menggoreng biasa (*deep frying*) merupakan proses penggorengan dengan bahan pangan yang digoreng terendam dalam minyak dan suhu minyak dapat mencapai 200–205<sup>0</sup>C. Sistem menggoreng *deep frying* umumnya digunakan oleh masyarakat di Indonesia (Ketaren, 2008).

Temperatur pada proses penggorengan biasa adalah sekitar 150°C. Pada temperatur tersebut, setiap bahan pangan rata-rata memerlukan waktu 8 menit untuk matang. Bila suhu pemanasan lebih tinggi dari pada suhu normal akan terjadi percepatan proses degradasi dan oksidasi minyak goreng (Edwar dkk, 2011).

Perubahaan fisik yang terjadi selama pemanasan menyebabkan perubahan indeks, bias, viskositas, warna, dan penurunan titik bakar. Keadaan tersebut menyebabkan penerimaan panas oleh minyak menjadi lebih cepat sehingga waktu yang dibutuhkan saat minyak mulai dipanaskan hingga mencapai titik bakar menjadi lebih cepat pada frekuensi menggoreng berikutnya. Akibat reaksi kompleks pada minyak, ikatan asam lemak tak jenuh berubah menjadi jenuh (Siswantika dkk, 2011). Semakin sering minyak goreng tersebut digunakan, maka semakin tinggi kandungan asam lemak jenuhnya, yaitu pada minyak yang belum dipakai (45,96%), 1 kali pakai (46,09%), dan 3 kali pakai (46,3250) (Imbiri,



2012). Asam lemak jenuh yang terbentuk antara lain asam laurat, asam miristat, asam palmitat, dan asam stearate. Asam lemak jenuh dengan presentase tertinggi adalah asam palmitat dan yang terendah adalah asam laurat. Sebaliknya, kandungan asam lemak tidak jenuh pada minyak yang belum dipakai (53,93%), 1 kali pakai (53,78%), 2 kali pakai (53,69%), dan 3 kali pakai (53,58%) (Yusuf dkk, 2013).

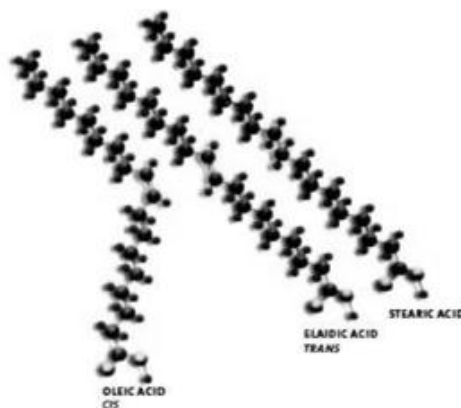
Reaksi kimia yang dapat terjadi pada minyak goreng selama penggorengan *deep frying* adalah hidrolisis, oksidasi, dan polimerasi yang menghasilkan komponen *volatile* dan *non volatile*. Komponen *volatile* akan menguap ke udara selama penggorengan dan sebagian lagi terserap ke dalam makanan gorengan. Komponen *volatile* akan menyebabkan terjadinya perubahan secara fisik dan kimia pada minyak goreng dan makanan gorengan. Komponen *volatile* inilah yang mempengaruhi kestabilan dan mutu, cita rasa dan tekstur makanan selama penyimpanan (Choe dan Min, 2005).

Kebanyakan ibu-ibu rumah tangga sering melakukan penggorengan bahan makanan dengan cara terputus-putus, artinya minyak yang sudah terpakai didinginkan, kemudian digunakan lagi untuk menggoreng bahan pangan lainnya. Penggorengan terputus ini mengakibatkan kerusakan minyak semakin cepat karena terjadi penambahan hiperperoksida selama pendinginan yang diikuti dengan dekomposisi jika minyak dipanaskan lagi (Imbiri, 2012). Semakin tinggi kandungan asam lemak jenuh pada minyak menandakan semakin menurunnya mutu dari minyak tersebut (Siswantika dkk, 2011). Hal ini meningkatkan radikal bebas atau yang biasa disebut *Reactive Oxydation Species* (ROS) yang dapat menyebabkan iritasi saluran pencernaan, diare, penyakit jantung koroner,

hipertensi, aterosklerosis, dislipidemia, stroke, dan kanker (Edwar dkk, 2011; Imbiri, 2012; Yusuf dkk, 2013).

Timbulnya bau dan rasa tengik merupakan tanda rusaknya minyak goreng, tidak hanya itu tanda rusaknya minyak goreng lainnya meliputi peningkatan kadar asam lemak bebas (FFA), bilangan iodium, angka peroksida, TBA, angka karbonil, timbulnya kekentalan minyak, terbentuknya busa dan adanya kotoran dari bumbu yang digunakan dan dari bahan yang digoreng. Semakin sering digunakan tingkat kerusakan minyak akan semakin tinggi. Penggunaan minyak berkali-kali akan mengakibatkan minyak menjadi cepat berasap atau berbusa dan meningkatkan warna coklat atau *flavor* yang tidak disukai pada bahan makanan yang digoreng (Wijana dkk, 2005).

Proses pemanasan minyak pada suhu tinggi dengan adanya oksigen akan mengakibatkan rusaknya asam-asam lemak tak jenuh yang terdapat di dalam minyak, seperti *asam oleat* dan *asam linoleate* memiliki struktur kimia seperti yang terdapat pada gambar 2.2. Kerusakan minyak akibat pemanasan dapat diamati dari perubahan warna, kenaikan bilangan peroksida, dan kenaikan kandungan *Urea Adduct Forming Esters*. Selain itu, dapat pula dilihat terjadinya penurunan bilangan iod dan penurunan kandungan asam lemak tak jenuh (Febriansyah, 2007).



(Jawi dkk, 2008)

Gambar 2.2

Struktur kimia dari cis-asam lemak tak jenuh (*asam oleat*), trans-asam lemak (*asam elaidat*) dan asam lemak jenuh (*asam stearate*)

Ketengikan (*Rancidity*) merupakan kerusakan atau perubahan bau dan *flavor* dalam lemak atau bahan pangan berlemak. Kemungkinan kerusakan atau ketengikan dalam lemak, dapat disebabkan oleh 4 faktor yaitu: absorpsi bau oleh lemak, aksi oleh enzim dalam jaringan bahan mengandung lemak, aksi mikroba dan oksidasi oleh oksigen udara, ataupun kombinasi dari dua atau lebih dari penyebab kerusakan tersebut di atas. Kerusakan-kerusakan tersebut dapat terjadi karena adanya perubahan perlakuan yang diberikan yang akan mengakibatkan timbulnya perubahan-perubahan kimia, contohnya adalah perlakuan panas (Ketaren, 2008).

Kerusakan lemak dapat terjadi karena oksidasi, baik secara *oto-oksidasi* (enzimatis) maupun secara *non-enzimatik*. Pemeriksaan kerusakan lemak dapat dikerjakan dengan memeriksa kandungan peroksida atau jumlah *Malondialdehid* (MDA) yang biasanya dinyatakan sebagai angka TBA (*Thiobarbituric Acidi*) (Ketaren, 2008).

Mutu minyak goreng sangat dipengaruhi oleh komponen asam lemaknya karena asam lemak tersebut akan mempengaruhi sifat fisik, kimia, dan stabilitas minyak selama proses penggorengan. Asam lemak bebas dalam jumlah besar akan terikut dalam minyak dan akan menurunkan mutu minyak. Kenaikan kadar ALB (Asam Lemak Bebas) disebabkan karena adanya reaksi hidrolisa pada minyak. Asam lemak bebas berfungsi untuk memecahkan lemak atau minyak menjadi asam lemak atau gliserol (Ketaren, 2008).

#### 2.1.6. *Malondialdehida* (MDA)

##### 2.1.6.1. Definisi

*Malondialdehida* (MDA) merupakan salah satu produk final dari peroksidasi lipid. Senyawa ini terbentuk akibat degradasi radikal bebas OH terhadap asam lemak tak jenuh yang nantinya menjadi radikal yang sangat reaktif.

MDA adalah senyawa *dialdehid* yang merupakan produk akhir peroksidasi lipid di dalam tubuh. Senyawa ini memiliki tiga rantai karbon dengan rumus molekul  $C_3H_4O_2$ . MDA juga merupakan produk dekomposisi dari *asam amino*, *karbohidrat kompleks*, *pentosa* dan *heksosa*. Selain itu, MDA juga merupakan produk yang dihasilkan oleh radikal bebas melalui reaksi ionisasi dalam tubuh dan produk samping biosintesis prostaglandin yang merupakan produk akhir oksidasi lipid membran. Di samping itu, MDA juga merupakan metabolit komponen sel yang dihasilkan oleh radikal bebas. Oleh sebab itu, konsentrasi MDA yang tinggi menunjukkan adanya proses oksidasi dalam membran sel. Status antioksidan yang tinggi biasanya diikuti oleh penurunan kadar MDA (Winarsi dkk, 2003).

MDA dapat bereaksi dengan komponen nukleofilik atau elektrofilik. Aktivitas non-spesifiknya, MDA dapat berikatan dengan berbagai molekul

biologis seperti protein, asam nukleat, dan aminofosfolipid secara kovalen. MDA dapat menghasilkan polimer dalam berbagai berat molekul dan polaritas. Efek negatif senyawa radikal maupun metabolit elektrofil ini dapat diredam oleh antioksidan, baik yang berupa zat gizi seperti vitamin A, C, E dan albumin, ataupun antioksidan non-gizi seperti flavonoid dan gingerol. Oleh karena itu, tinggi rendahnya kadar MDA sangat bergantung pada status antioksidan dalam tubuh seseorang (Winarsi, 2007).

#### 2.1.6.2. Biokimia *Malondialdehida* (MDA)

Radikal bebas memiliki waktu paruh yang sangat pendek sehingga sulit diukur dalam laboratorium. Kerusakan jaringan lipid akibat ROS dapat diperiksa menggunakan senyawa MDA. MDA merupakan senyawa hasil peroksidasi lipid yang terbentuk dari peroksidasi lipid pada membran sel yaitu reaksi radikal bebas (radikal hidroksi) dengan PUFA. Reaksi tersebut terjadi secara berantai akan menghasilkan sejumlah radikal lipid dan senyawa yang sangat sitotoksik terhadap endotel. Radikal-radikal lipid tersebut akan bereaksi dengan logam-logam transisi bebas dalam darah seperti  $\text{Fe}^{2+}$  dan  $\text{Cu}^{2+}$  menghasilkan aldehyd toksik, salah satunya adalah MDA. Eliminasi MDA dari sirkulasi dengan bantuan enzim *aldehid dehidrogenase* dan *thiokinase* yang terjadi dihepar terjadi dalam waktu 2 jam pada tikus namun 10-30% melekat semi permanen pada protein dan dieliminasi dalam waktu 12 jam (Winarsi, 2007).

Toksisitas MDA meningkat karena reaktivitasnya yang tinggi terutama terhadap protein dan DNA. Kadar MDA telah digunakan secara luas sebagai indikator stres oksidatif pada lemak tak jenuh sekaligus merupakan indikator keberadaan radikal bebas. MDA merupakan senyawa berbentuk kristal putih yang



higroskopis diperoleh dari hidrolisis asam 1,1,3,3 *tetraethoxypropane*. Radioaktif C-MDA dapat dibuat dari 1,3 *propanediol* menggunakan alkohol *dehidrogenase* (Winarsi, 2007).

Stres oksidatif adalah keadaan yang tidak seimbang antara antioksidan yang ada dalam tubuh dengan produksi ROS. Stres oksidatif dapat menyebabkan terjadinya reaksi peroksidasi lipid, protein termasuk enzim dan DNA, yang dapat menyebabkan terjadinya kerusakan oksidatif. Kerusakan oksidatif pada senyawa lipid terjadi ketika senyawa radikal bebas bereaksi dengan senyawa PUFA. Peroksidasi lipid merupakan reaksi berantai yang terus menghasilkan pasokan radikal bebas sehingga terjadi reaksi peroksidasi-peroksidasi selanjutnya (Kothari dkk, 2010).

#### 2.1.6.3. Cara Pengukuran *Malondialdehida* (MDA)

Metode pengukuran MDA yang sering digunakan adalah metode *Thio Barbituric Acid Reactive Substances* (TBARS) menggunakan spektrofotometer atas dasar penyerapan warna yang terbentuk dari reaksi TBARS dan MDA. Tes ini didasarkan pada reaksi kondensasi antara satu molekul MDA dengan dua molekul TBARS pada pH rendah. Reaksi ini terjadi pada suasana asam pada suhu 90-100<sup>0</sup> C, TBARS akan memberikan warna pink-cromogen yang dapat diperiksa secara spektrofotometrik pada panjang gelombang 530-535 nm atau fluoresen pada panjang gelombang 553 nm. Jumlah MDA yang terdeteksi menunjukkan banyaknya peroksidasi lipid yang terjadi. Tes TBARS selain mengukur kadar MDA yang terbentuk karena proses peroksidasi lipid juga mengukur produk non-volatil yang terbentuk akibat panas yang ditimbulkan pada saat pengukuran kadar MDA plasma yang sebenarnya (Asni, 2014).

Kadar MDA dapat diperiksa baik di plasma, jaringan, maupun urin. Metode pengukuran MDA lain adalah dengan pengukuran kadar MDA serum bebas menggunakan *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) namun metode ini membutuhkan penanganan sampel yang sangat rumit. Pengukuran MDA dipengaruhi oleh variasi diurnal, spesimen hemolisis dan jenis spesimen. Sampel hemolisis dapat menyebabkan peningkatan kadar MDA oleh karena itu pemisahan sampel harus dilakukan secepat mungkin dalam waktu kurang dari 30 menit. Penggunaan sampel serum mendapatkan hasil yang lebih tinggi dibandingkan sampel plasma dengan antikoagulan (Mudassir dkk, 2012).

## 2. 2 Katuk (*Sauropus androgynous* L.)

### 2.2.1 Taksonomi Daun Katuk

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi	: Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi	: Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Magliopsida (Berkeping ganda)
Ordo	: Euphorbiales
Famili	: Euphorbiaceae
Genus	: Sauropus
Spesies	: <i>Sauropus androgynous</i> (L.) Merr.



(Zuhra, 2008)

Gambar 2.3  
Daun Katuk (*Sauropus androgynous* L.).

#### 2.2.2 Nama lain

Katuk mempunyai beberapa nama yang berbeda di setiap daerah di Indonesia antara lain memata (Melayu), simami (Minangkabau), katuk (Sunda), katukan (Jawa), simani (Minangkabau) dan kerakur (Madura). Di luar negeri tanaman ini bernama *sweet leaf bush/star gooseberry* (Inggris), cekur manis/cekak manis/tarok manis (Malaysia), so kun mu (Cina), dan ruridama no (Jepang) (Azis dan Muktiningsih, 2006).

#### 2.2.3 Morfologi Daun Katuk

Tanaman katuk termasuk tanaman perdu dengan tinggi mencapai 3,5 meter. Tanaman katuk banyak terdapat di Asia Tenggara dan tumbuh baik di dataran rendah hingga 1.300 meter di atas permukaan laut (Suwanto, 2014).

Tanaman katuk mempunyai daya adaptasi yang luas terhadap lingkungan di daerah tropis. Di Indonesia, tanaman katuk dapat tumbuh dan berproduksi dengan baik di daerah dataran rendah sampai dataran tinggi (pegunungan) yang memiliki ketinggian anatar 5 m – 1.300 m dpl. Tanaman katuk juga toleran terhadap

keadaan teduh (naungan) sehingga cocok ditanam di lahan pekarangan. Di daerah yang memiliki ketinggian lebih dari 1.300 m dpl., tanaman katuk masih dapat tumbuh, meskipun dengan pertumbuhan yang agak lambat dan ukuran daun kecil-kecil sehingga produksi tanaman cenderung turun (Azis dan Muktiningsih, 2006).

Tanaman katuk berupa perdu yang tumbuh menahun, daun katuk yang berbentuk ramping sering ditanam sebagai tanaman pagar dengan tinggi tanaman sekitar 1-2 meter. Batang tanaman katuk tumbuh tegak dan saat tanaman katuk berumur muda, batangnya berwarna hijau. Setelah tua, warna batang menjadi kelabu keputihan. Daun tanaman katuk merupakan daun majemuk yang berjumlah genap. Bunganya berbentuk unik dan berwarna putih semu kemerahan. Kelopaknya keras, buahnya berbentuk bulat, berukuran kecil, dan berwarna putih, serta bijinya beruang empat. (Suwanto, 2010).

#### 2.2.4 Budidaya

Tanaman katuk merupakan tanaman yang mudah dibudidayakan. Tanaman katuk secara alami berkembang biak dengan biji, namun untuk menghasilkan masa panen yang cepat, budidaya tanaman katuk dapat dilakukan dengan stek batang. Tanaman katuk mudah tumbuh terutama di daerah dengan kandungan air tanah yang tinggi atau pada musim hujan dan tidak membutuhkan perawatan yang khusus. Setelah 30-45 hari setelah ditanam, daun katuk bisa dipanen (Pitojo, 2009; Yuliani dan Hasanah, 2000).

#### 2.2.5 Kandungan dan Manfaat dalam Daun Katuk

Daun katuk mengandung energi (59 kkal/100 g), protein (4,8 g/100 g), lemak (1 g/100 g), karbohidrat (11 g/100 g), dan vitamin B1 (0,1 mg/100 g).

Kadar serat per 100 gram daun katuk adalah 1,5 gram. Komposisi mineral pada daun katuk juga tinggi, yaitu dominan kalsium (204 mg/100 g), fosfor (83 mg/100 g), dan besi (2,7 mg/100 g). Daun katuk mengandung vitamin C yang merupakan senyawa antioksidan sebesar 244 mg/100 gram dimana kandungan ini melebihi kandungan pada jeruk, pepaya, jambu biji, dan bayam yang sering disebut sebagai sumber vitamin C. Kandungan vitamin A yang didapat dari 100 gram daun katuk sebesar 10.370 SI (Zuhra dkk, 2008).

Daun katuk termasuk tanaman langka yang mengandung vitamin K, setiap 100 gram zat daun katuk mengandung sebanyak 204 mg atau empat kali lebih tinggi dibandingkan kandungan mineral dari daun kol. Kandungan kalori, protein dan karbohidrat daun katuk hampir setara dengan daun pepaya dan daun singkong, namun kandungan zat besi daun katuk lebih unggul. (Agoez, 2010).

Daun katuk dimanfaatkan sebagai zat warna alami makanan karena daun katuk mengandung klorofil yang cukup tinggi. Kadar klorofil pada daun katuk sebesar 1509.1 mg/kg (Nurdin dkk, 2009). Sebuah penelitian membuktikan bahwa daun katuk kaya klorofil, yaitu 8% dari berat kering, paling banyak di antara jenis tanaman lain. Klorofil atau zat hijau adalah molekul kimia yang terdapat pada tumbuhan yang aktivitas utamanya adalah membantu reaksi fotosintesis (Suwarto, 2010). Berikut konsentrasi klorofil dari berbagai daun tanaman yang ditampilkan pada table 2.1.

Tabel 2.1 Konsentrasi klorofil dari berbagai daun tanaman

Jenis daun	Berat (g)	Konsentrasi Klorofil (mg/kg)		
		a (645 nm)	B (663 nm)	Total
Pegagan	0.2	612.5	219.0	831.5
Katuk	0.2	1136.6	372.5	1509.1
Murbei	0.2	651.7	192.5	844.2
Cincau hijau	0.2	1300.0	408.7	1708.8

(Nurdin dkk, 2009)



Klorofil tak hanya terdapat di bagian daun, tetapi juga di batang, biji, umbi, atau buah. Klorofil mempunyai manfaat yang baik bagi tubuh manusia. Klorofil dapat membersihkan jaringan tubuh dan tempat pembuangan sisa limbah metabolisme, sekaligus mengatasi parasit, bakteri, dan virus yang ada dalam tubuh manusia (Suwanto, 2010).

Di samping kaya protein, lemak, vitamin, dan mineral, daun katuk juga memiliki kandungan tannin, saponin, fenol, flavonoid, dan alkaloid papaverin (Agoez, 2010). Daun katuk juga mengandung banyak flavonoid (831,70 mg/100 g). Golongan flavonoid utama yang terdapat dalam daun katuk adalah golongan *flavonol OH-3* tersulih atau golongan *flavon* (Zuhra dkk, 2008). Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa daun katuk mempunyai zat gizi tinggi, mengandung zat antibakteri, serta tidak berbahaya bagi kesehatan (Santoso, 2010).

Daun katuk memiliki kadar kalsium yang tinggi. Kalsium merupakan salah satu mineral terpenting yang dibutuhkan oleh tubuh. Konsumsi kalsium kurang dari kebutuhan dapat menyebabkan rapuhnya integritas tulang dan osteoporosis di usia dini, umumnya terjadi pada wanita. Daun katuk juga mengandung efedrin yang sangat baik bagi penderita *Influenza* (Suwanto, 2010). Pada table 2.2 akan diuraikan komposisi kimia dari daun katuk.

Tabel 2.2 Komposisi Kimia Daun Katuk

Komponen gizi	Kadar
Energi (kkal)	59
Protein (g)	4,8-6,4
Lemak (g)	1,0
Karbohidrat (g)	9,9-11,0
Serat (g)	1,5
Abu (g)	1,7
Kalsium (mg)	204
Fosfor (mg)	83
Besi (mg)	2,7-3,5
Vitamin A (SI)	10.370
Vitamin C (mg)	164-239
Vitamin B1 (mg)	0,1
Vitamin B6 (mg)	0,1
Vitamin D (µg)	3.111
Karotin (mcg)	10.020
Air (g)	81

(Santoso, 2008)

#### 2.2.6 Mekanisme Daun Katuk Dalam Menurunkan *Malondialdehid* (MDA)

##### Plasma

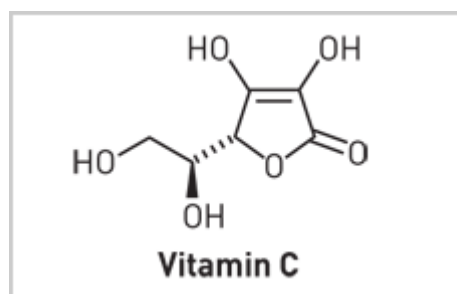
Antioksidan adalah zat yang dapat melawan bahaya dari radikal bebas yang terbentuk sebagai hasil metabolisme oksidatif, yaitu hasil dari reaksi-reaksi kimia dan proses metabolik yang terjadi di dalam tubuh (Amrun dkk, 2007).

Untuk kehidupannya, manusia maupun hewan tergantung pada oksigen. Oksigen yang esensial berguna untuk kehidupan, bekerja melalui mekanisme reaksi berurutan di dalam sel-sel tubuh, mempunyai batasan fungsi dan kemudian dapat memberikan efek samping. Reaksi oksidasi yang lebih kompleks akan menghasilkan radikal bebas, yang apabila tidak terdapat sistem antioksidan, akan menghancurkan elemen vital sel-sel tubuh. Penyakit yang menimpa manusia melibatkan oksidasi pada tingkat subseluler dari sel, sebagai penyebab maupun sebagai reaksi lanjutan. Selanjutnya akan menyebabkan kerusakan jaringan yang merupakan tanda dari keseluruhan gejala patologi (Muchtadi, 2009). Antioksidan

dalam daun katuk yang terbukti dapat menurunkan kadar MDA adalah vitamin C, flavonoid dan fenol.

Vitamin C memiliki struktur sangat mirip dengan glukosa. vitamin C terdapat dalam bentuk asam askorbat maupun *dehidroaskorbat*, pada gambar 2.5 ditampilkan struktur kimia dari vitamin C. Asam askorbat diabsorpsi usus halus dan hampir seluruh asam askorbat dari makanan terabsorpsi sempurna. Asam askorbat masuk sirkulasi untuk didistribusikan ke sel-sel tubuh. Asam askorbat dioksidasi in-vivo menjadi radikal bebas askorbil. Sebagian proses reversibel menjadi asam askorbat kembali, sebagian menjadi dehidroaskorbat yang akan mengalami hidrolisis, oksidasi dan akhirnya diekskresi melalui urin (Sulistiyowati, 2006).

Vitamin C bersifat hidrofilik dan berfungsi paling baik pada lingkungan air sehingga merupakan antioksidan utama dalam plasma terhadap serangan radikal bebas. Sebagai zat penyapu radikal bebas, vitamin C dapat langsung bereaksi dengan superoksida dan anion hidroksil, serta berbagai hidroperoksida lemak. Sedangkan sebagai antioksidan pemutus-reaksi berantai untuk menekan produksi *Malondialdehid* (Sulistiyowati, 2006).



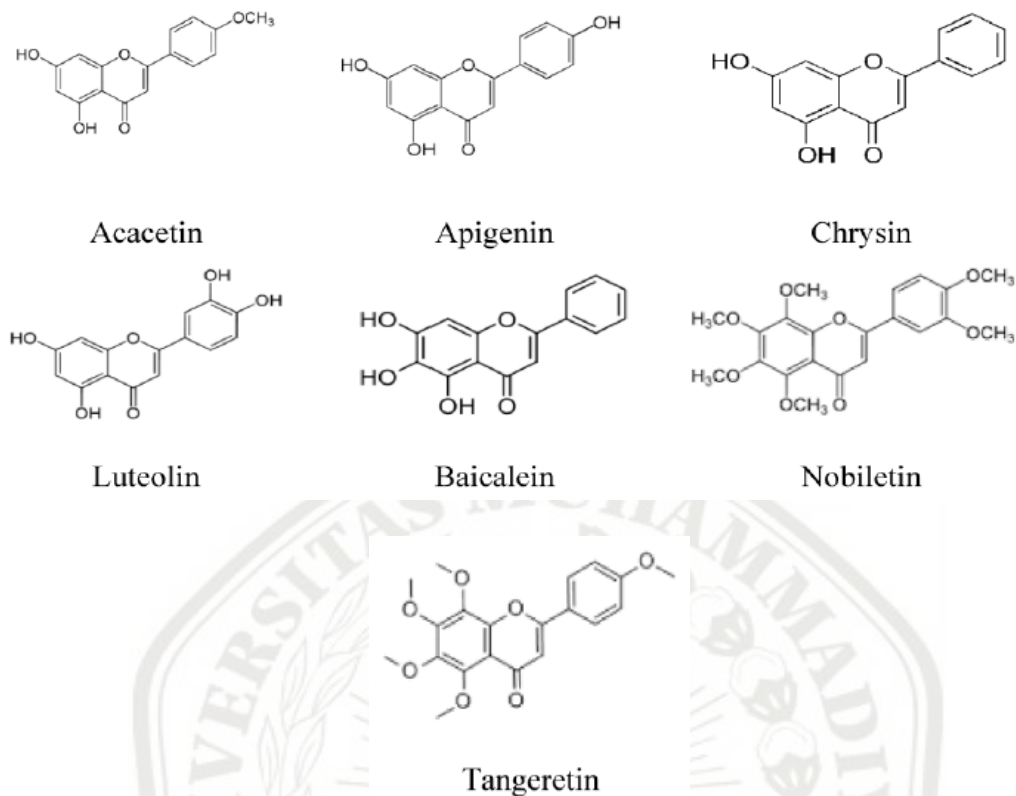
(Sulistiyowati, 2006)

Gambar 2.4  
Struktur kimia vitamin C

Vitamin C pada daun katuk berperan sebagai penangkap radikal bebas dengan cara mendonorkan satu elektron ke senyawa logam Cu sehingga dapat menstabilkan senyawa oksigen reaktif (Moreno *et al.*, 2006; Winarsi, 2007).

Kelompok Kerja Nasional Tumbuhan Obat Indonesia menunjukkan bahwa tanaman katuk mengandung beberapa senyawa kimia, antara lain alkaloid papaverin, protein, fenol, lemak, vitamin, mineral, saponin, flavonoid (flavon), tannin dan beberapa vitamin seperti vitamin C. Kegunaan flavonoid sebagai antioksidan telah banyak diteliti, dimana flavonoid memiliki kemampuan untuk merubah atau mereduksi radikal bebas dan juga sebagai anti radikal bebas (Bunawan *et al.*, 2015).

Flavonoid adalah senyawa-senyawa polifenol yang terdiri dari 15 atom karbon ( $C_6-C_3-C_6$ ) ditandai dengan dua cincin benzena bergabung dengan rantai tiga karbon membentuk heterosiklik oksigen. Flavonoid merupakan kelompok dari senyawa fenolik dan merupakan salah satu kelompok dari metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman (Xiao *et al.*, 2008). Golongan flavonoid meliputi flavon, flavonol, isoflavon, katekin, flavonol, dan kalkon (Kumalaning, 2006). Flavonoid yang terdapat dalam daun katuk adalah flavonoid jenis flavon yang memiliki subklas *acacetin*, *apigenin*, *chrysin*, *tangeretin*, *luteonil*, *baicalein*, dan *nobiletin* yang ditampilkan pada gambar 2.6. (Koosha *et al.*, 2016).



(Koosah, 2016)

Gambar 2.5

Kerangka senyawa *acacetin*, *apigenin*, *chrysin*, *tangeretin*, *luteonil*, *baicalein*, dan *nobiletin*.

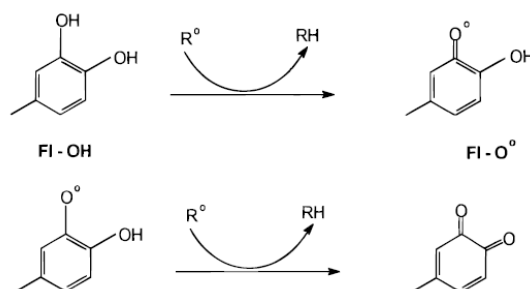
Dari koosah, 2016 menyebutkan bahwa senyawa-senyawa turunan flavonoid tersebut dapat mencegah terjadinya mutasi DNA yang akan mengakibatkan kanker. Flavonoid juga dapat mencegah  $\geq 3$  reaksi perusakan dari radikal bebas sekaligus meningkatkan fungsi dari antioksidan endogen (Nijveldt et al, 2013).

#### a. *Direct Radical Scavenging*

Salah satu cara perlindungan tubuh dari radikal bebas oleh flavonoid adalah menjadi *Direct Radical Scavenging*. Rantai hidroksil ( $\bullet\text{OH}$ ) dari flavonoid dapat menstabilkan senyawa ROS yaitu, dengan bereaksi pada rantai reaktifnya seperti yang ditampilkan pada gambar 2.7.. Dalam fungsinya sebagai *Scavenged radical*, Flavonoid mencegah terjadinya stress oksidatif



yang mengakibatkan mutasi DNA dan mencetuskan penyakit kanker (Nijveldt et al, 2013).



(Han, dkk, 2012)

Gambar 2.6  
Penambahan ion Hidrogen oleh Flavonoid

#### b. Nitrit oksida (NO)

Flavonoid dapat menurunkan terjadinya iskemia dengan mengganggu aktivitas induksi enzim *nitrit-oxide synthase*. *Nitrit-oxide synthase* adalah enzim yang menginduksi pembentukan nitrit oksida (NO). NO diproduksi oleh berbagai sel tubuh, termasuk sel endotel dan makrofag dan berfungsi sebagai vasodilator pembuluh darah. Namun, konsentrasi NO yang berlebih akibat induksi *nitrit-oxide synthase* pada makrofag dapat menyebabkan kerusakan sel. Hal ini dikarenakan, aktivasi pada makrofag secara signifikan akan meningkatkan pembentukan NO dan *anion superoksida*. NO yang bereaksi dengan radikal bebas akan membentuk peroksinitrit yang sangat merusak serta secara langsung dapat mengoksidasi LDL dan merusak membran sel, sehingga flavonoid yang bekerja sebagai *Radical scavenged* dapat meminimalisir reaksi antara radikal bebas dan NO (Nijveldt et al, 2013).

c. Xanthine oxidase

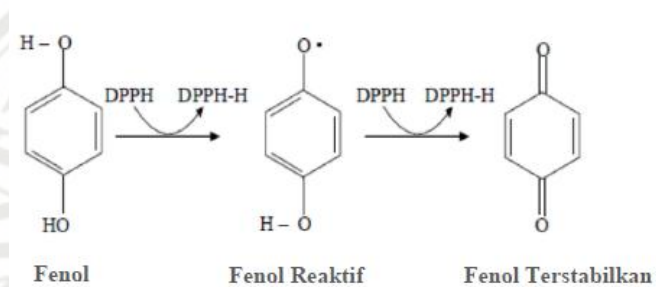
Jalur metabolisme *xanthine oxidase* terlibat dalam jalur penting terjadinya stres oksidatif jaringan, khususnya setelah terjadinya iskemia. *Xanthine dehydrogenase* dan *xanthine oxidase* terlibat dalam metabolisme *xanthine* menjadi asam urat. *Xanthine dehydrogenase* adalah enzim yang terdapat saat kondisi fisiologis, namun enzim ini berubah menjadi *xanthine oxidase* saat terjadi iskemia. *Xanthine oxidase* adalah sumber dari oksigen radikal. Saat fase reperfusi (reoksigenasi), *xanthine oxidase* bereaksi dengan molekul oksigen dan melepaskan radikal superoksida. Flavonoid bekerja dengan cara menghambat kerja enzim *xanthine oxidase*, sehingga dapat menurunkan kejadian stress oksidatif (Nijveldt et al, 2013).

d. Imobilisasi Leukosit

Imobilisasi dan adhesi leukosit pada sel endotel adalah mekanisme mayor lain yang tidak hanya bertanggung jawab terhadap terbentuknya oksigen radikal tetapi juga terbentuknya oksidan sitotoksik dan mediator inflamasi. Pada kondisi fisiologis, leukosit beredar bebas di sepanjang dinding endotel. Namun, selama iskemia dan inflamasi, beberapa mediator dan komplemen menjadikan adhesi leukosit pada dinding endotel, serta melumpuhkan leukosit dan menstimulasi degranulasi neutrofil. Beberapa penelitian melaporkan, bahwa flavonoid berfungsi menurunkan kejadian imobilisasi leukosit selama cedera reperfusi dan hal ini berhubungan dengan penurunan komplemen serta mediator pro-inflamasi (Nijveldt et al, 2013).

Antioksidan lain dari daun katuk adalah senyawa fenolik yang ikut serta dalam penghambatan karsinogenik dan menghambat proliferasi sel sehingga

mampu menghambat perkembangan tumor setelah inisiasi melalui *cell cycle arrest*. Fenol mempunyai efek kardioprotektif, yakni antioksidan yang sangat kuat. Senyawa fenol mampu mencegah oksidasi LDL 20 kali lebih kuat dibandingkan dengan vitamin E. Sirait (2007) menyatakan bahwa gugus hidroksil dari fenol mampu menangkap radikal bebas (Gambar 2.8). Fenol mampu meredam sifat radikal senyawa oksigen reaktif seperti superoksida, radikal peroksida, radikal hidroksil, dan peroksinitrit. Sehingga mencegah kemunduran atau kehancuran sel akibat reaksi oksidasi (Rohmatussolihat, 2009).



(Marliana dan Cholisoh, 2012)

Gambar 2.7.

Mekanisme Peredaman Radikal Bebas Oleh Fenol